信号肽对亮氨酸脱氢酶在 *B.subtilis* 中分泌表达的影响及酶学性质研究*

王男 张玲 林荣 金吕华 宋祖坤 杨海麟*一

（江南大学生物发酵与分离实验室 无锡 214122）

摘要：根据信号肽 N 端电荷数，选择 Sec 及 Tat 两种途径的信号肽构建枯草芽孢杆菌穿梭质粒，首次实现 *Bacillus cereus* 源亮氨酸脱氢酶基因在 *Bacillus subtilis* 中的分泌表达。Tat 途径信号肽 PhoD 促进蛋白分泌的效果最好，胞外酶活力达 20.25U/ml，为不添加信号肽的 2.2 倍，信号肽 N 端较多的电荷数，可能有利于多聚体蛋白的分泌。对表达产物进行纯化和酶学性质测定。结果表明，纯酶比酶活为 13U/mg；L-Leucine 为底物时酶的 Km 为 6.17mM，Vmax 为 14.49umol·min^{-1}·mg^{-1}；底物特异性研究发现，酶与天然底物 L-Leucine 的亲和性最好，对一些脂肪族氨基酸也有活性，对芳香族氨基酸 L-Phenylalanine 无活性；酶的最适 pH 为 10.5~12，pH 稳定范围为 5.0-11.0；最适反应温度为 55℃；圆二色谱变温扫描酶二级结构变化，α 螺旋含量随温度升高逐渐降低；差示扫描微量热技术(DSC)测定酶的解折叠温度（Tm 值）为 64.13℃，表明该酶具有较好耐热性。

关键词 信号肽 亮氨酸脱氢酶 枯草芽孢杆菌 酶学性质

亮氨酸脱氢酶（EC 1.4.1.9，LeuDH）以 NAD$^+$为辅酶，能可逆的催化 L-亮氨酸及一些支链氨基酸产生相应的酮酸及其类似物，也可以催化α-酮酸还原成手性氨基酸[1]。亮氨酸脱氢酶可用于医药中间体手性氨基酸的生物催化[2]；临床生化诊断上，可偶联尿酶测定血清中尿素含量，辅助检测肾脏疾病[3]以及分析血清中亮氨酸氨肽酶等[4]。

目前研究较多的亮氨酸脱氢酶主要来源于芽孢杆菌，多为 6-8 个亚基的同源多聚体。研究者利用单亚基基因构建基因工程菌。*Bacillus cereus* DSM626 来源的亮氨酸脱氢酶在 *E.coli* 中过表达，粗酶液酶活为 16U/mg，活性酶占可溶性蛋白 28%[5]；*Bacillus cereus* ATCC14579 来源的亮氨酸脱氢酶，在 *E.coli* 中实现高

收稿日期:2017-11-23　　修回日期: 2017-12-24

*　江苏省产学研 BY2016022-40

** 通讯作者，电子信箱: yanghailin@jiangnan.edu.cn

效表达,重组菌粗酶液比酶活为7.59U/mg[6]；*Bacillus sphaericus* IFO 3525来源的亮氨酸脱氢酶在*E.coli* JM109中表达后的比酶活为10.6U/mg，是原始菌酶活的25倍[7]。这些研究主要集中在大肠杆菌的异源表达。基于亮氨酸脱氢酶在制药方面的应用，对酶的安全性要求更高，有必要选择安全性更高表达宿主。相比大肠杆菌，*B.subtilis*具有不易形成包涵体、表达产物直接分泌到胞外，后期分离纯化便利等优点，有较好的工业生产应用基础。

选择合适的信号肽是实现异源蛋白在枯草芽孢杆菌中高效分泌表达的有效手段。目前，对于信号肽与蛋白质本身的相容性缺乏了解，最佳信号肽的获得只能通过大量筛选实现。在*B.subtilis*中研究较多的为Sec和Tat途径，这两种途径的信号肽有相似的结构：（1）带正电荷的N端（2）疏水核心H区（3）含有信号肽酶识别位点的C区。Tat途径在结构上有明显的双精氨酸模型SRRxΦΦ，Φ为疏水氨基酸残基，x为任意氨基酸残基[8]。信号肽结构和分泌路径对蛋白分泌影响显著，Sagiya等[9]通过增加N端电荷数，使金枪鱼生长激素（tGH）产量为240mg/L，产率增加了10倍。Gabriela Flores等[10]将异源二聚体青霉素G酰化酶（PGA）构建为单链PGA，当使用Sec途径前导肽时，产生功能性单链变体，使用Tat途径没有产生活性蛋白，可见信号肽分泌路径及结构对重组蛋白实现最佳分泌表达至关重要。

本实验将*B.cereus* ATCC14579的亮氨酸脱氢酶基因在枯草芽孢杆菌中进行表达，并根据信号肽N端电荷数，选择4种Sec途径信号肽LipB、NprE、AmyQ和SacB及3种Tat途径信号肽LipA、YwbN和PhoD构建分泌表达质粒。比较不同信号肽对亮氨酸脱氢酶分泌表达的影响。对获得的亮氨酸脱氢酶进行酶学特性研究，为工业上实现*B.cereus*生产亮氨酸脱氢酶提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒 *E.coli* JM109、*B.subtilis* 168、表达质粒pMA5、pHT43均由本实验室保存；亮氨酸脱氢酶基因（*leudh*）由南京金斯瑞合成。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA连接酶、rTaq DNA聚合酶、蛋白质Low Marker、DNA Marker均购自大连宝生物有限公司；DNA凝胶回收试剂盒：Axygen；革兰氏阳性细菌DNA抽提试剂盒，蛋白胨、酵母膏：上海生工股份有

限公司；其他所用试剂均购于国药集团药业股份有限公司。

1.1.3 培养基 LB 培养基（g/l）：蛋白胨 10g，酵母粉 5g，NaCl 10g；TB 培养基（g/l）：蛋白胨 12g，酵母粉 24g，甘油 5g，$K_2HPO_4.3H_2O$ 16.43g，KH_2PO_4 2.3g。

1.2 方 法

1.2.1 重组质粒 pMA5-*leudh* 的构建 以全基因合成的 *leudh* 为模板，引物 F1/R1（C 端引入 6×His）进行 PCR，引入酶切位点 *Bam*H I/*Mlu* I。分别对 PCR 产物、质粒 pMA5 双酶切，跑胶回收片段用 T4 DNA 连接酶连接过夜，得到重组质粒 pMA5-*leudh*。转化 *E.coli* JM109，阳性转化子由苏州泓讯生物有限公司进行测序。

1.2.2 含不同信号肽重组质粒的构建 以 *B.subtilis* 168 的 DNA 为模板，（DNA 抽提参考试剂盒），设计引物 PCR 扩增信号肽序列，引入 *Nde* I/*Bam*H I 位点，双酶切信号肽序列及 pMA5-*leudh*，跑胶回收后酶连转化 *E.coli* JM109，菌落 PCR 验证阳性转化子并测序。其中信号肽 AmyQ 克隆模板为 pHT43。

1.2.3 重组菌培养条件 将重组质粒转化 *B.subtilis* 168，具体方法参考江南大学夏雨博士论文 [11]。挑单菌落于 LB 培养基（100ug/ml Kan^r）中培养过夜，次日按 5%接种量转接至 50ml TB 培养基（100ug/ml Kan^r）中培养 48h 后，4℃，8000r/min 离心 10 min，收集发酵上清液。

表 1 引物序列表

Table1 List of primers

Name	Sequence
F1	CGC<u>GGATCC</u>ATGACCCTGGAGATCTCCGAAT
R1	CG<u>ACGCGT</u>TTAATGATGATGATGATGATGACGACGGCTAATGATATCGTGACCG
LipA-F	GGGAATTC<u>CATATG</u>AAATTTGTAAAAAGAAGGATC
LipA-R	CGC<u>GGATCC</u>GGCTTTTGCTGACGGCTG
SacB-F	GGGAATTC<u>CATATG</u>AACATCAAAAAGTTTGCAAAAC
SacB-R	CGC<u>GGATCC</u>CGCAAACGCTTGAGTTGCGCCT
AmyQ-F	GGGAATTC<u>CATATG</u>ATTCAAAAACGAAAGCGGACAG
AmyQ-R	CGC<u>GGATCC</u>TACGGCTGATGTTTTTGTAATC
LipB-F	GGGAATTC<u>CATATG</u>GTGAAAAAAGTACTTATGGCAT

LipB-R	CGCGGATCCAGCTTTTGCGCCAGACGGCGGAG
NprE-F	GGGAATTCCATATGGGTTTAGGTAAGAAAT
NprE-R	CGCGGATCCACCTTCAGCAGCCTGAAC
PhoD-F	GGGAATTCCATATGGCATACGACAGTCGTTTTG
PhoD-R	CGCGGATCCGGCCCCAACCGACTGGGCAATC
YwbN-F	GGGAATTCCATATGAGCGATGAACAAAAAAAGCC
YwbN-R	CGCGGATCCCGCAACGGCTGCCCCCGCCAT

注：下划线为限制酶酶切位点

1.2.4　重组 LeuDH 活测定及 SDS-PAGE 分析　反应体系 3ml，在含 20mM 亮氨酸的 0.2M 甘氨酸-KCl-KOH（pH 10.5）缓冲液中加入 12.5mM NAD^+溶液，37℃平衡 5 min 后加入酶液摇匀，不加酶液为对照，340nm 波长测定 3 min 内吸光值变化。酶活定义为上述条件下，每分钟生成 1umol NADH 所需的酶量为一个酶活单位。重组酶用 SDS-PAGE 进行表观分子量估算，采用 Bradford 法[12]测定蛋白浓度。

1.2.5　重组 LeuDH 的纯化　将发酵液于 4℃，8000r/min 离心 30 min，取上清。上清过 0.45um 滤膜，通过 AKTA avant 上样亲和层析柱 HistrpHP 1ml。

1.2.6　重组 LeuDH 酶学性质分析

1.2.6.1　动力学参数测定　用 0.2M 甘氨酸-KCl-KOH 溶液配置不同浓度的亮氨酸-甘氨酸-KCl-KOH 溶液（0.2-20mM），测定相应浓度酶活。利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法，求出酶的 K_m 和 V_{max} 值。

1.2.6.2　底物特异性测定　将 20mM 的不同底物 L-Leucine、L-Valine、L-Isoleucine、L-Norvaline 、L-Methionine、L-Phenylalanine、L-Ala，用 0.2M 甘氨酸-KCl-KOH 溶液溶解，加入等浓度酶液，以 L-leucine 活性为 100%，测定其他底物的相对活性。

1.2.6.3　最适温度和温度稳定性　在 30-85℃范围内测定亮氨酸脱氢酶酶活，确定最适反应温度。将酶液分别放入 30、37、40、50、55、60、65、70℃条件下，于 25mM 磷酸缓冲液中放置 20 min，测定不同温度下酶活力。

1.2.6.4　最适 pH 及 pH 稳定性　配置 pH 为 8.0-12.0 的亮氨酸-甘氨酸-KCl-KOH 溶液，按酶活检测方法测活性。将酶液分别用 pH 为 4.0-12.0 的缓冲液稀释,于 25℃

放置 16h，测定酶活。

1.2.6.5 圆二色谱测定二级结构 取酶液（0.08mg/ml，缓冲液体系为水）进行变温二级结构测定。分析条件为：扫描波长 190-220nm，比色皿直径 1cm，分别测定 25、45、55、65、85 ℃下酶液的椭圆率(θ)，通过在线网站 http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml 预测二级结构。

1.2.6.6 差示扫描微量热仪（Nano DSC）测定 Tm 值 将酶液用 PB 缓冲液透析 8h，降低盐离子浓度。超滤浓缩纯酶至 0.2-1mg/ml，通过 Nano DSC 测定纯酶的 Tm 值。数据由 Launch NanoAnalyze 软件分析拟合。

2 结果与讨论

2.1 重组 LeuDH 的表达及鉴定

全合成 *B.cereus* ATCC14579 源的 *leudh* 为模板，PCR 扩增目的基因，电泳鉴定大小与理论相符，目的基因与 pMA5 构建表达载体 pMA5-*leudh*，双酶切验证正确，见图 1。重组质粒转化宿主构建重组菌 *B.subtilis* 168/pMA5-*leudh*，发酵表达测定上清活性为 9.04U/ml。对表达蛋白进行 SDS-PAGE 分析可知，亮氨酸脱氢酶分子量大小约 44kDa（图 2）。

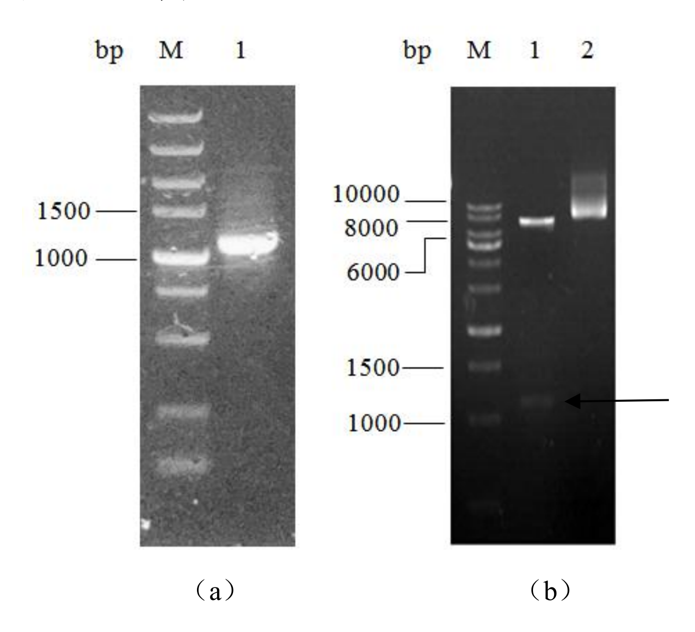


图 1 重组质粒 pMA5-*leudh* 的 PCR (a)与双酶切(b)验证

Fig. 2-1 PCR of *leudh* (a) and pMA5-*leudh* by restriction digestion(b)

(a) M: marker 1: *leudh* (b) M: marker 1: restriction digestion pMA5-*leudh* by *Bam*H I and *MIu* I 2: pMA5-*leudh*

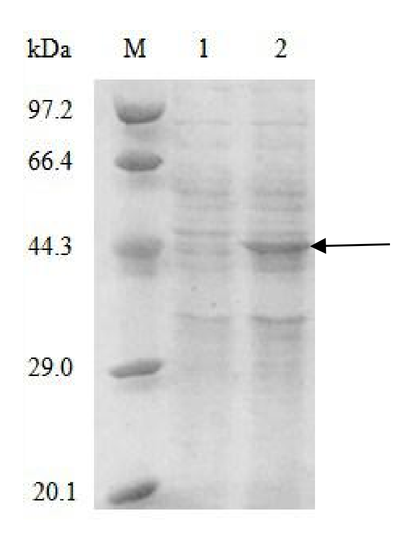


图 2 重组菌 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed LeuDH

M: Protein Marker(Low) 1: extracellular of *B.subtilis* 168/pMA5 2: extracellular of *B.subtilis* 168/pMA5-*leudh*

2.2 不同信号肽对亮氨酸脱氢酶分泌表达水平的影响

按照 N 端正电荷数不同，选择 Sec 和 Tat 两种途径中共 7 种信号肽，其中 AmyQ、SacB、LipB、NprE 为 Sec 途径，N 端电荷数分别为 4、3、2、2；PhoD、YwbN、LipA 为 Tat 途径，N 端电荷数分别为 6、5、4。将 7 种信号肽通过质粒 pMA5 上 *Nde* I/*Bam*H I 酶切位点插入 *ldh* 基因前端，构建分泌表达质粒，如图 3。

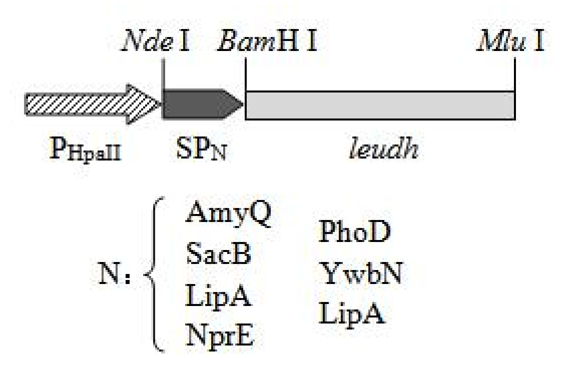


图 3 信号肽构建示意图

Fig 3 Schematic diagram of signal peptides

Promoter P_{HhpaII}; Different signal peptides; *leudh*:leucine dehydrogenase gene

表 2 不同信号肽引导的 LeuDH 活性比较

Table 2 Comparision of LeuDH activity via different signal peptides

SP 分泌途径	SP	N 端电荷数	胞外活性（U/ml）
Sec	AmyQ	4	16.80
	SacB	3	14.09
	LipB	2	0.23
	NprE	2	0.13
Tat	PhoD	6	20.25
	YwbN	5	1.91
	LipA	4	0.78

结果表明，Tat 途径 PhoD 胞外表达量最高，活性 20.25U/ml；Sec 途径中 AmyQ 和 SacB 表达效果较好，胞外活性分别为 16.80U/ml 和 14.09U/ml，Tat 途径信号肽优于 Sec 途径信号肽，见表 2。Tat 途径最大特点是利于转运折叠后蛋白及多聚体蛋白[13-14]，*B.cereus* 源的 LeuDH 多为同源多聚体，该酶在 PhoD 信号肽引导下，分泌效果最好，说明 Tat 途径更适合 LeuDH 的分泌表达。分析 Sec 途径信号肽分泌效果，可看出 N 端电荷数为 2 的 LipB 和 NprE 信号肽，胞外分泌量明显低于 N 端电荷数为 3、4 的 SacB 和 AmyQ 信号肽；Tat 途径中 N 端电荷数为 6 的 PhoD 分泌最佳，电荷数为 4 的 LipA 信号肽最差。两种途径呈现相同效果，N 端电荷数高，蛋白分泌表达量高，证明 N 端电荷数影响蛋白分泌表达，电荷数提高有促进作用。信号肽 YwbN、LipA、LipB 和 NprE 分泌量低可能是多肽中的新的结构域排列对 mRNA 的转录翻译造成影响，导致活性降低。各重组菌 SDS-PAGE 分析见图 4。

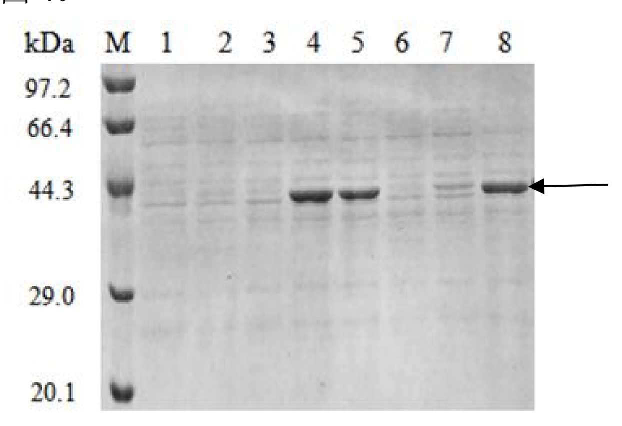


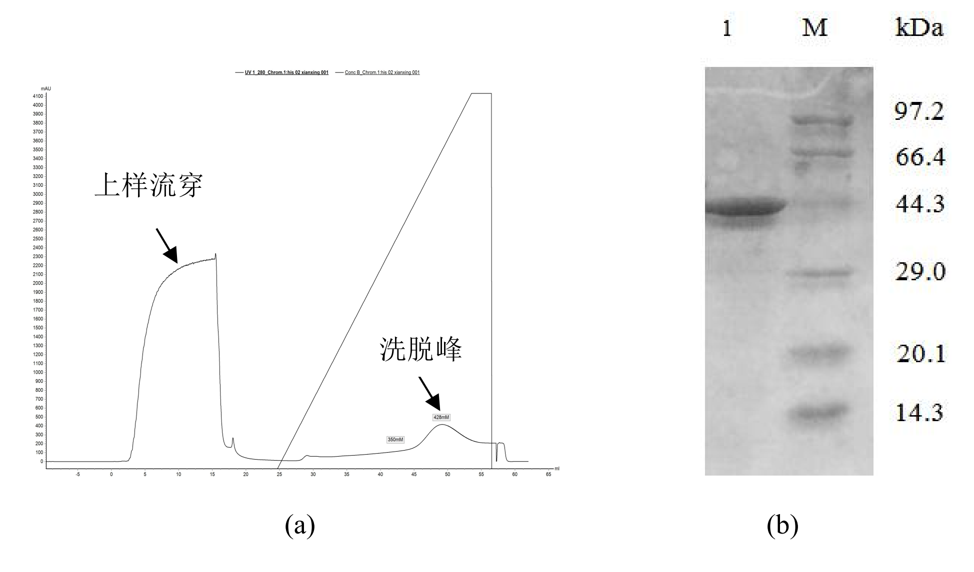
图 4 不同信号肽介导的 LeuDH 发酵上清 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of LeuDH extracellular activity via different signal peptides

M: Protein Marker(Low)1: 168/pMA5 2: 168/pMALipB 3: 168/pMANprE 4: 168/pMAAmyQ 5: 168/pMASacB 6: 168/pMALipA 7: 168/pMAYwbN 8: 168/pMAPhoD

2.3　重组 LeuDH 纯化

将重组菌发酵上清离心、过滤膜后上镍柱纯化。咪唑浓度为350mM时LeuDH开始洗脱，428mM 为最佳洗脱浓度。纯化后酶活达到13U/mg，对纯酶跑SDS-PAGE 电泳，得到单一条带（图 5）。



(a)　　　　(b)

图 5　重组亮氨酸脱氢酶纯化 UV 峰图（a）及 SDS-PAGE 鉴定（b）

Fig. 5 UV absorption peak of purified leucine dehydrogenase (a) and SDS-PAGE analysis(b)

2.4　重组 LeuDH 酶学性质分析

2.4.1　动力学参数测定

K_m值是酶的特征性常数之一，它不仅是酶性质的体现，而且在实际应用中也发挥重要作用。测定亮氨酸脱氢酶对底物 L-Leucine 的 K_m 值和 V_{max} 值。结果分别为 6.17mM，14.49umol • min^{-1} • mg^{-1}（图 6）。由 Km 值可知，L-leucine 是比较合适的底物。

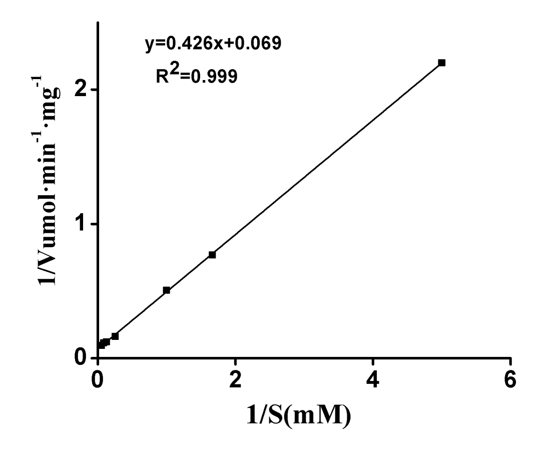


图 6 LeuDH 对底物 L-leucine 的动力学曲线

Fig. 6 Dynamic curve of LeuDH to substrate L-leucine

2.4.2 底物特异性测定

根据已有报道[15]，选择不同底物进行特异性分析，结果见表 3。从结果中可以看出亮氨酸脱氢酶对不同的氨基酸都能表现出活性，其中对大多数脂肪族氨基酸有活性且相对活性较高，氨基酸的支链结构影响酶的活性；对一些芳香族氨基酸没有活性。

表 3 LeuDH 氧化反应底物特异性

Table 3 Substrate Specificity of LeuDH Oxidation

底物	结构	相对酶活（%）
L-leucine	COOH NH2	100%
L-Isoleucine	COOH NH2	89%
L-Valine	COOH NH2	76%
L-Norvaline	OH O H2N	52%
L- Alanine	COOH NH2	5%
L-Methionine	S COOH NH2	3%
L- Phenylalanine	COOH NH2	0%

2.4.3 最适 pH 及 pH 稳定性

pH 对酶的影响主要体现在影响酶结构的稳定性及酶分子和底物分子上某些基团的解离状态。在 pH 4.0-12.0 范围内研究重组酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性，结果如图 7 所示。酶最适 pH>10.5，且在 pH 5.0-11.0 范围内均显示出高活力，在 pH 低于 5.0 及高于 11.0 后酶活明显下降。与上海蓝园商业化亮氨酸脱氢酶在 pH 6.0-11.0（25℃，16h）稳定性相似。

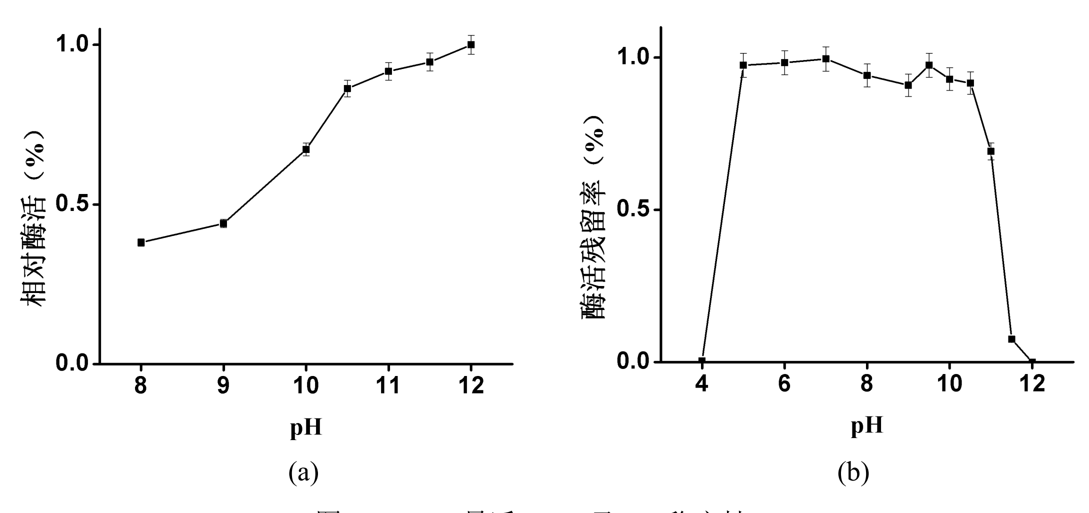


图 7 LeuDH 最适 pH(a)及 pH 稳定性(b)

Fig. 7 LeuDH optimum pH (a) and pH stability (b)

2.4.4　最适温度和温度稳定性

温度过低或过高，都影响酶的活性。只有在最适温度下，酶活力才能发挥最佳水平。如图 8 所示，重组酶的最适反应温度为 55℃，之后随着温度的升高酶变性，活性下降。与相同来源的 LeuDH 在 *E.coli* 表达最适温度 37℃相比明显提高[6]，耐热性增强；酶液置于 30-70℃放置 20 min，在 60℃酶活残留率保持 80%以上，证明良好稳定性。

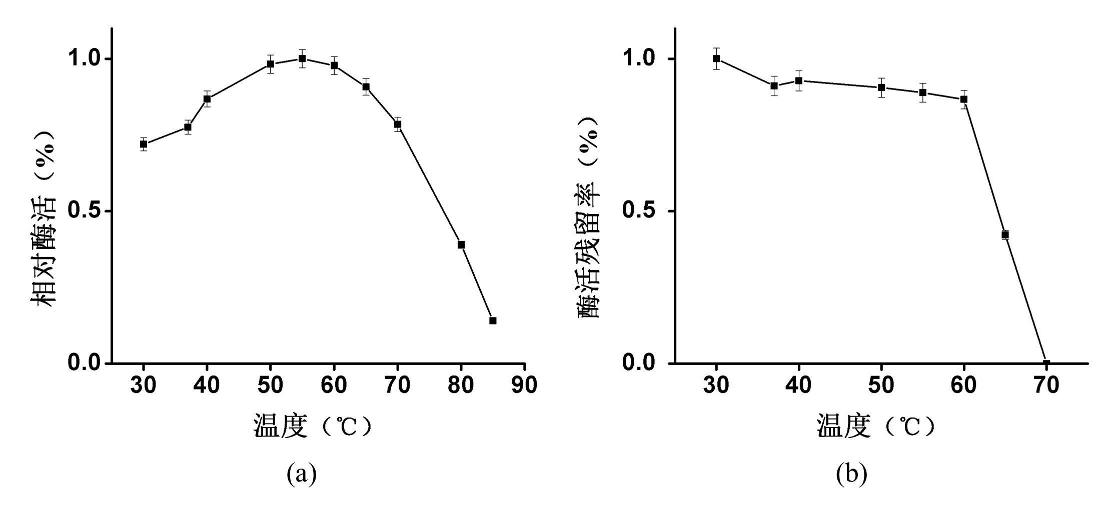


图 8 LeuDH 最适温度(a)及温度稳定性(b)

Fig. 8 LeuDH optimum temperature (a) and temperature stability (b)

2.4.5　二级构象变化

将 LeuDH 进行变温二级结构分析，见图 9。温度较低时，酶的二级结构吸收峰完整；温度升高至 85℃，吸收峰破坏严重，大部分处于解折叠状态，α 螺

旋含量逐渐降低，仅为 11.4%，说明 α 螺旋结构完整利于酶的稳定，见表 4。对于 65℃时 β 折叠和转角含量出现较大波动，可能是由于此时同源多聚体多处于解聚状态，更多的结构暴露导致的。

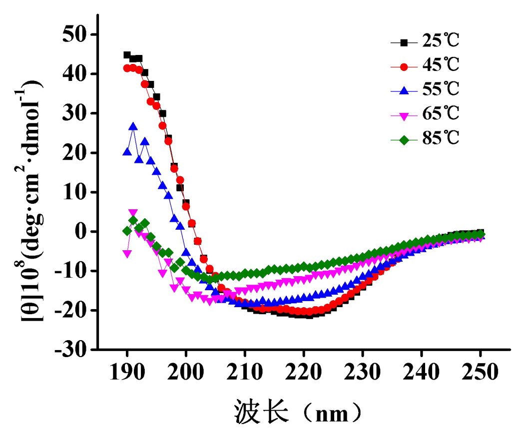


图 9 不用温度下 LeuDH 圆二色谱分析

Fig. 9 Analysis of circular dichroism of LeuDH under different temperature

表 4 不用温度下 LeuDH 二级结构分析

Table. 4 Analysis of secondary structure of LeuDH under different temperature

温度	α 螺旋（%）	β 折叠（%）	转角（%）	无规卷曲（%）
25℃	82.1	1.1	7.6	9.2
45℃	76.5	0.9	7.2	15.4
55℃	75.9	0.8	6.9	16.4
65℃	17.4	23.5	18.6	40.5
85℃	11.4	8.0	6.7	73.9

2.4.6 Tm 值的测定

T_m值为加热使 DNA 双链解螺旋至一半时的温度，是引物的一个重要参数。Nano DSC 测定 Tm 为 64.13℃，△H=877.5KJ/mol，对同源多聚体蛋白 Tm 值仅显示单个峰（图 10）。与 TOYOBO 商业化 *Bacillus sp.*源 LeuDH 温度稳定性小于 60℃相比，热稳定性好。

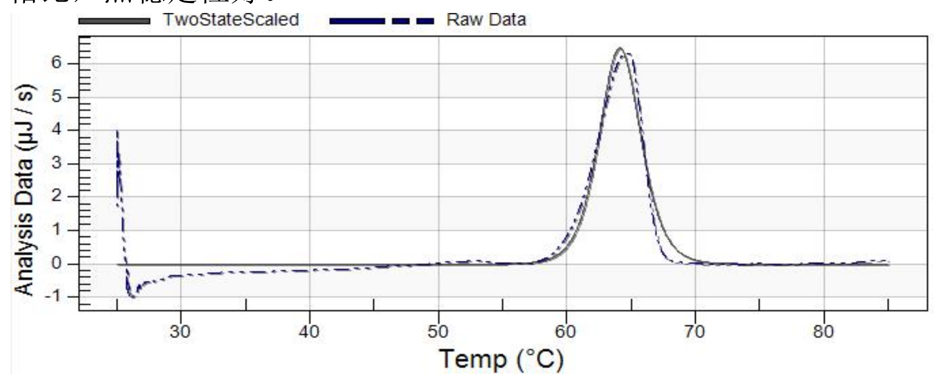


图 10 重组 LeuDH T_m 值

Fig.10 T_m of recombinant LeuDH

3 小 结

将来源于 *B.cereus* 的亮氨酸脱氢酶基因转化到 *B.subtilis* 168 中，首次实现 LeuDH 在枯草芽孢杆菌中的表达。为进一步提高 LeuDH 的胞外活性，根据信号肽 N 端电荷数不同，选择 Sec 途径和 Tat 途径共 7 种信号肽进行研究。Sec 途径中 N 端电荷数为 4、3、2、2 的信号肽 AmyQ、SacB、LipB 和 NprE，胞外活性分别为 16.80U/ml、14.09U/ml、0.23U/ml、0.13U/ml；Tat 途径中 N 端电荷数为 6、5、4 的信号肽 PhoD、YwbN 和 LipA 胞外活性分别为 20.25U/ml、1.91 U/ml 和 0.78 U/ml。

两种途径呈现相同效果，N 端电荷数高，蛋白分泌表达量高，表明 N 端电荷数影响蛋白分泌表达，电荷数提高有一定促进作用。信号肽 PhoD 是目前唯一严格按照 Tat 途径分泌表达的信号肽[16]，该信号肽分泌效果和活性最佳。Tat 途径可能更适合 LeuDH 的分泌表达。信号肽的筛选和优化促进了 LeuDH 在枯草芽孢杆菌中的分泌效果和表达活性。

酶学性质分析看出，酶对底物 L-Leucine 的 Km 为 6.17mM，Vmax 为 14.49umol·min^{-1}·mg^{-1}，底物亲和力较好；酶底物谱广，除天然底物 L-leucine 外，对部分脂肪族氨基酸表现活性；最适 pH 为 10.5-12.0，pH 稳定性范围为 5.0-11.0，有良好的 pH 耐受性；最适反应温度为 55℃，酶液在 60℃放置 20min 酶活残留率保持 80%以上，有良好热稳定性；圆二色谱变温扫描酶二级结构变化，表明α螺旋结构完整利于酶的稳定；Tm 测定为 64.13℃，进一步证明酶热稳定性高，可为工业上高产亮氨酸脱氢酶提供参考。

参考文献

[1] Katoh T, Ngata S, Ozawa A et al. Purification and characterization of leucine dehydrogenase from an alkalphilic halophile, *Natronobacterium magadii* MS-3. Joumal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003,23(2-6):231-238.

[2] Jing Li, Jiang Pan, et al. Stereoselective synthesis of L-tert-leucine by a newly cloned leucine dehydrogenase from *Exiguobacterium sibiricum*. Joumal of Molecular Catalysis B:

Enzymatic, 2014,105:11-17.

[3] 李圃，吴鸿君，等. 脲酶-亮氨酸脱氢酶偶联法测定尿素的方法学评价. 四川医学, 2005,26(11):1234-1235.

Li P, Wu J R, et al. Methodological evaluation of urease-leucine dehydrogenase coupling assay for urea. Sichuan: Sichuan Medical Journal, 2005,26(11):1234-1235..

[4] Shizuo Takamiya, Toshihisa Ohshima, et al. Spectrophotometric End Point Method for Assaying Serum Aminopeptidase. Agricultural and Biological Chemistry, 1983,47(4):893-895.

[5] Tanja Stoyan, Achim Recktenwald, et al. Cloning, sequencing and overexpression of the leucine dehydrogenase gene from *Bacillus cereus*. Journal of Biotechnology, 1997,54(1):77-80.

[6] 陈宝珍，李红梅，段琳琳. 蜡样芽胞杆菌亮氨酸脱氢酶基因在大肠杆菌中的表达及重组酶性质. 工业微生物, 2015,45(4):39-45.

Chen B Z, Li H M, Duan L L. Characterization and expression of leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus* in *E.coli*. Industrial Microbiology, 2015,45(4):39-45.

[7] Reina Katoh, Shinji Nagata et al. Cloning and sequencing of the leucine dehydrogenase gene from *Bacillus sphaericus* IFO 3525 and importance of the C-terminal region for the enzyme activity [J]. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003,23(2-6):239–247.

[8] Colin R, Harwood and Rocky Cranenburgh. *Bacillus* protein secretion: an unfolding srory. Cell, 2007,16(2):73-79.

[9] Sagiya Y, Yamagata H, Udak S. Direct high-level secretion into the culture medium of tuna growth hormone in biologically active form by *Bacillus brevis*. Appl Microbiol Biotechnol, 1994,42(2):358-363.

[10] Gabriela Flores, Xavier soberon, et al. Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin G acylase. Protein science, 2004,13(6):1677-1683.

[11] 夏雨.枯草芽孢杆菌食品级表达系统的构建和分泌表达研究. 无锡：江南大学, 2007.

Xia Y. Construction of food-grade expression systems and study of protein secretion in *Bacillus subtilis*. Wuxi: Jiangnan University, 2007.

[12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976,72(1):248-254.

[13] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH. Signal peptide-dependent protein transports in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. Microbiology and Molecular Biology reviews, 2000,64(3):515-547.

[14] Edward Spence, Mary Sarcina, et al. Membrance-specific targeting of green fluorescent protein by the Tat pathway in the *cyanobacterium synechocystis* PCC6803. Molecular microbiology, 2003,48(6):1481-1489.

[15] Hongmei Li, Dunming Zhu et al.Cloning, Prorein sequence clarification, and Substrate specificity of a leucine dehyrogenase from *Bacillus sphaeericus* ATCC4525. Appl Biochem Biotechnol, 2009,158(2):343-351.

[16] Tjalsma H, Antelmann H, et al. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: Sepatating the "Secrets" of the secretome. Microbiology and Molecular Biology reviews, 2004,68(2):207-233.

The Effect of Signal Peptides on the Expression of Leucine Dehydrogenase and Enzymatic Properties in *Bacillus subtilis*

WANG Nan ZHANG Ling LIN Rong JIN Lv-hua SONG Zu-kun YANG Hai-lin

(Jiangnan University, Laboratory of Biological Fermentation and Separation, Wuxi 214122, China)

Abstract According to the different N-terminal positive charges, Sec and Tat passway signal peptides were selected to construct the shuttle plasmid with pMA5, which was the first time that the leucine dehydrogenase gene from *Bacillus cereus* was efficiently secreted in *Bacillus sutilis*. The results showed that PhoD signal peptide had the highest exogenous activity, reaching 20.25U/ml, which was 2.2 times higher than that without signal peptide. The enzymatic properties of the purified leucine dehydrogenase were investigated. The purified enzyme expression level was 13U/mg; the Michaelis constants Km and Vmax were 6.17mM and 14.49umol • min^{-1} • mg^{-1} for L-leucine, separately. The enzyme had the best affinity with the natural substrate L-Leucine, and showed activity toward some the aliphatic amino acids; no activity was observed for the Aromatic amino acids L-Phenylalanine; the optimum pH was 10.5~12.0 and the stability was maintained at pH 5.0-11.0; the optimum reaction temperaturewas 55 ℃, The changed of the secondary structure at different temperatures by circular dichroism proved that the α-helical t α-helix content gradually decreased with increasing temperature; DSC measured Tm value of 64.13℃, indicating that the enzyme had high thermal stability..

Key words Signal peptides Leucine dehydrogenase *Bacillus subtilis* Enzymatic properties